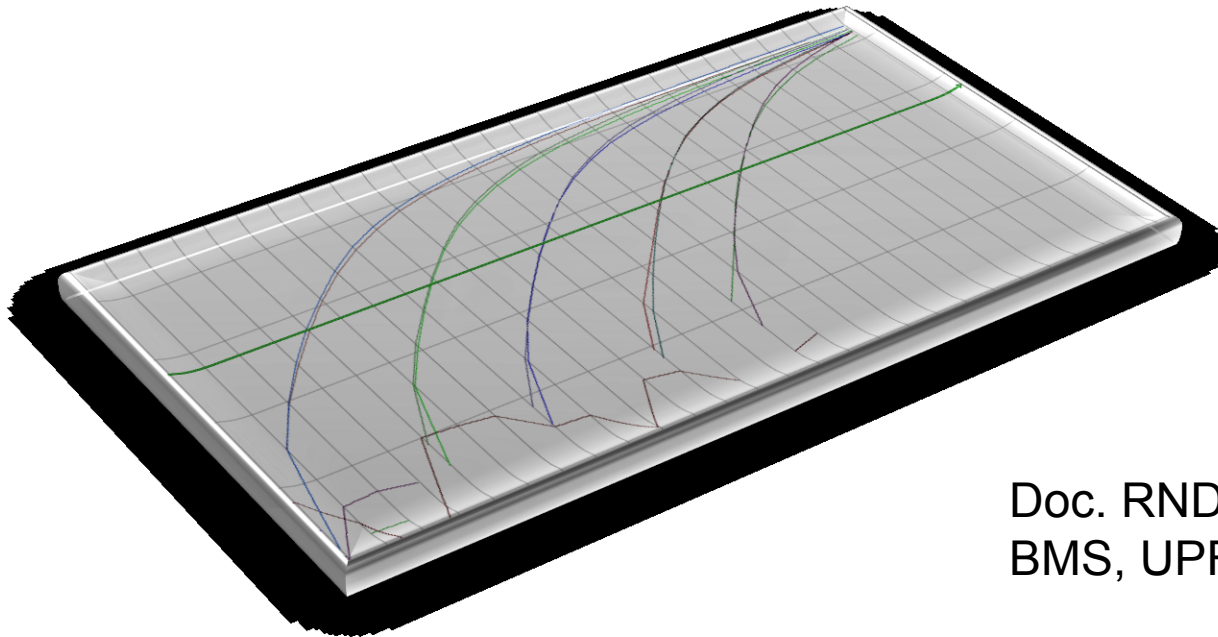


IZOLACE NK A REAL-TIME PCR



Doc. RNDr. Sabina Ševčíková, PhD
BMS, UPF LF MU

DNA a RNA

- DNA
- RNA
 - mRNA - mediátorová
 - tRNA - transferová
 - rRNA - ribozomální

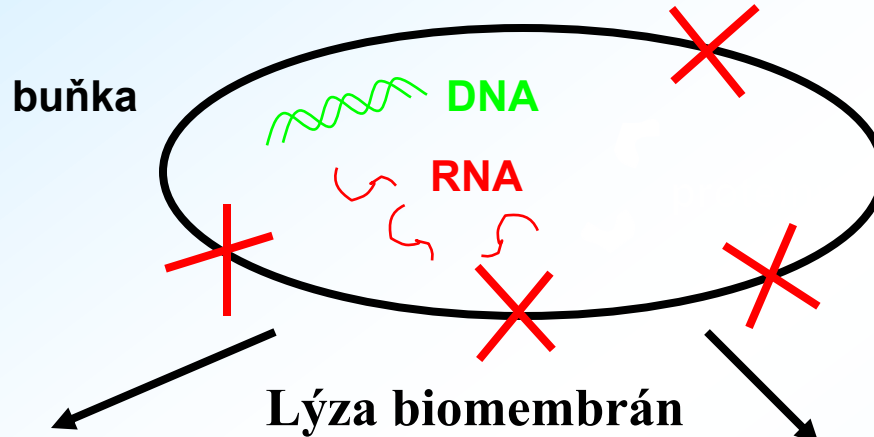
Molekulární diagnostika

- Diagnostika na úrovni DNA, RNA
- Analýza kvalitativní a kvantitativní

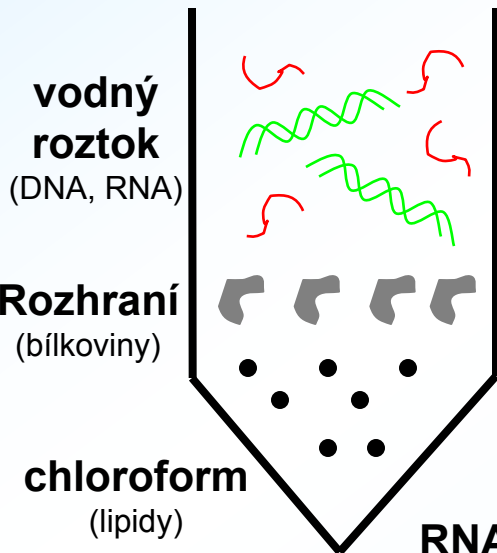
Izolace DNA a RNA

- Získ DNA nebo RNA v dostatečném množství a čistotě
- Kvalita rozhoduje o úspěchu dalších metod
- Vliv metody na další použití

Přístupy k izolaci DNA



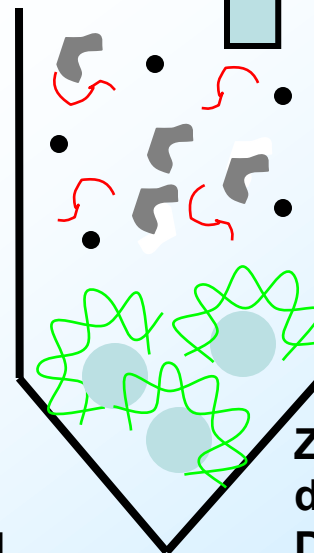
A. Odstraňujeme lipidy extrakcí chloroformem, bílkoviny srážením fenolem



Nukleové kyseliny zůstávají v roztoku, bílkoviny se sráží a sedimentují odstředěním na rozhraní, lipidy jsou extrahovány do chloroformu

RNA je příp. odstraněna RNázou

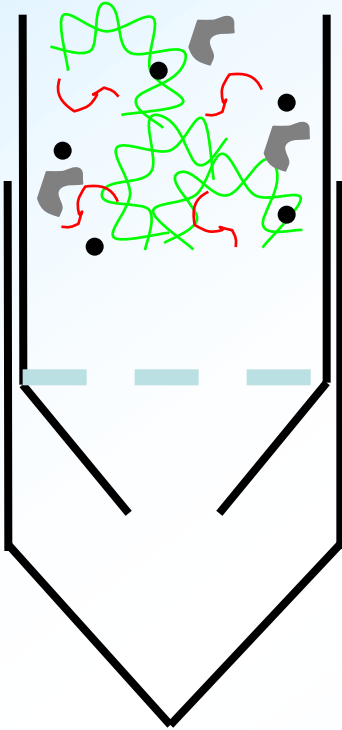
B. Za určitých podmínek adsorbujeme DNA na povrch SiO_2 , ostatní odsajeme



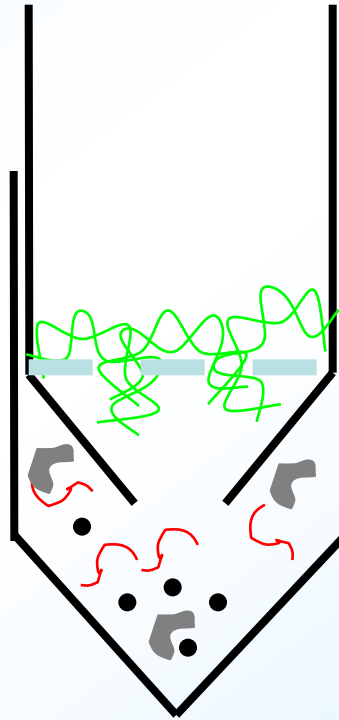
SiO_2 je obvykle v podobě skleněných částic, které jsou těžké, snadno sedimentují, ostatní lze odsát.

Kolonky Qiagen

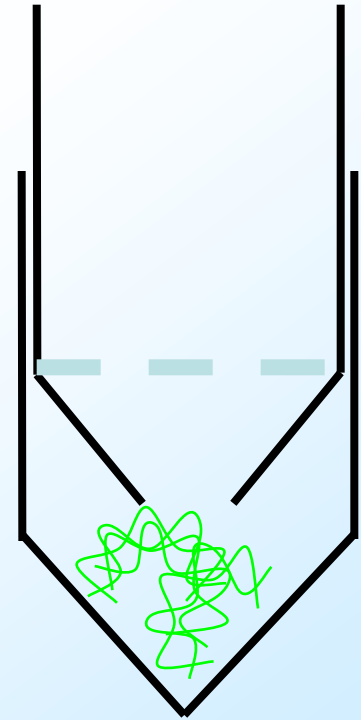
buněčný lyzát



centrifugace



promytí a uvolnění



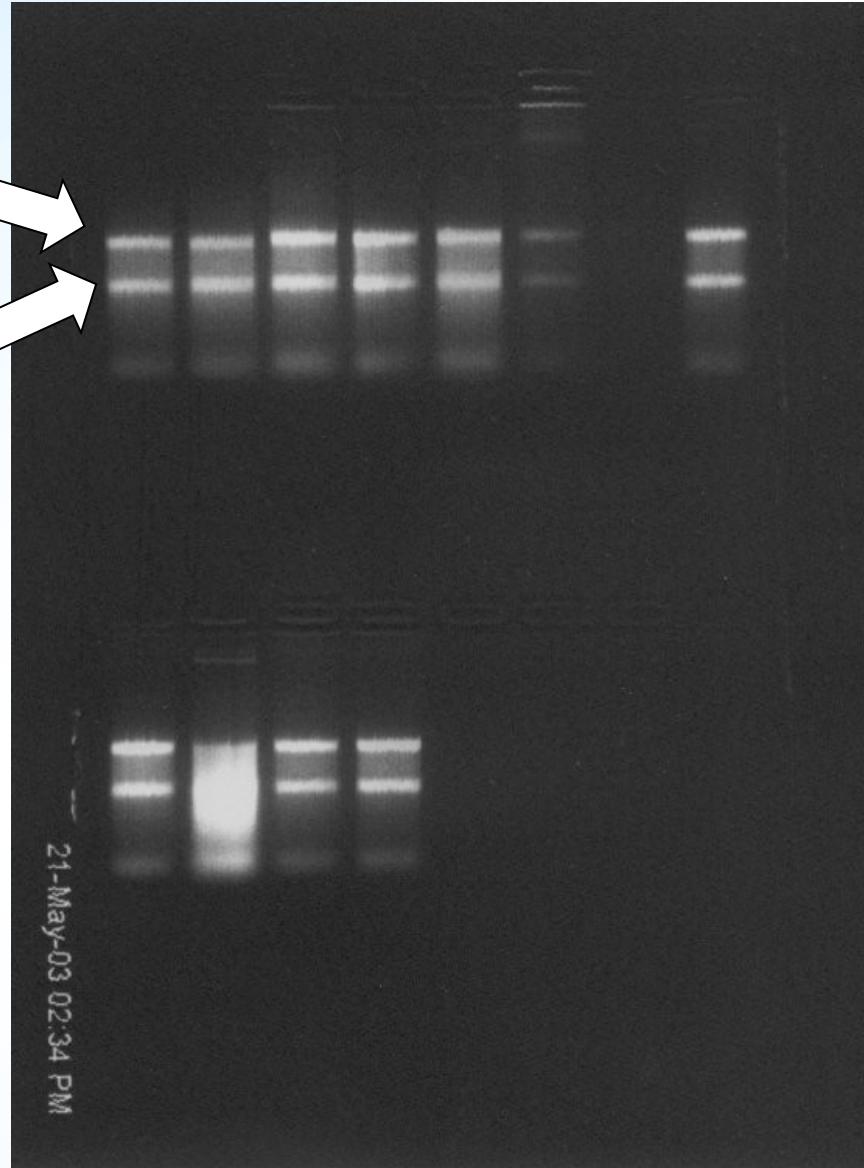
Izolační kolonky



Izolace RNA

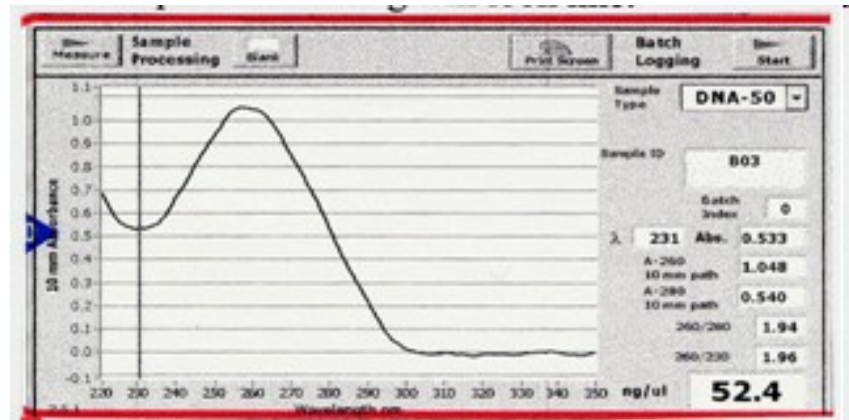
28S

18S



Kvantifikace NK - nanodrop

- Kvantifikace DNA, RNA, proteinů
- Bezkyvetový spektrofotometr
- Měří 0,5-2ul vzorku
- Od 5ng/ul do 3000 ng/ul
- 260/280nm
- 260/230 nm



RNA extrakce

- Z čerstvého materiálu
- RNA uskladněna v -80C nebo ve speciálních roztocích
- Zpracovávat 10-20 vzorků
- DNase I ke zbavení kontaminace DNA

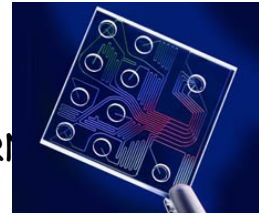
RNA kontrola kvality

- Vysoká čistota (bez kontaminací)
- Vysoká integrita (bez degradace)
- Jakékoliv nečistoty - inhibice PCR (proteiny)
- $OD_{260/280}$ 1.8-2.0 bez proteinů
- $OD_{260/230}$ 1.8-2.0 bez organických nečistot
- $RIN > 7$
- Konsistentně používat čistotu a integritu - redukce variability

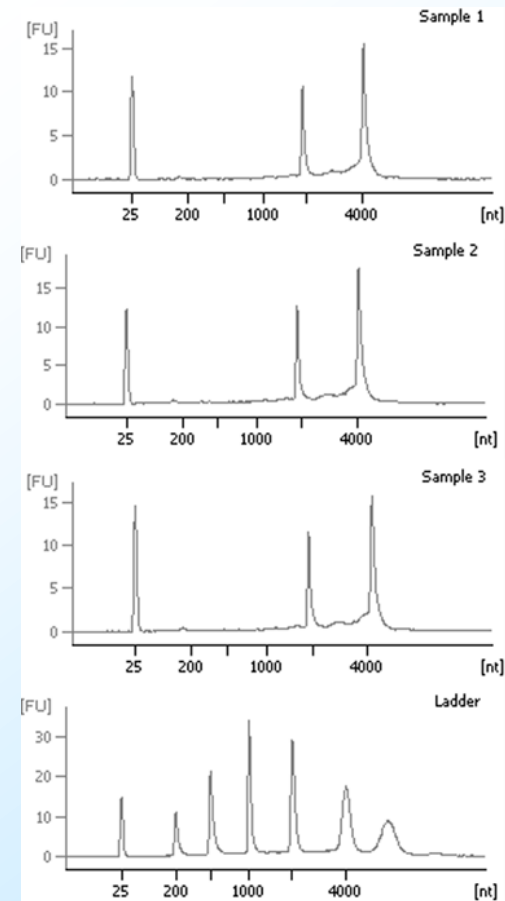
Čistota

- 260/280 nm - 1,8 čistá DNA, 2,0 čistá RNA (nižší - proteiny, fenol)
- 260/230 nm - 2-2,2 (EDTA, fenol)
- Záleží na koncentraci - pokud moc nízká, čistota nebude dobrá

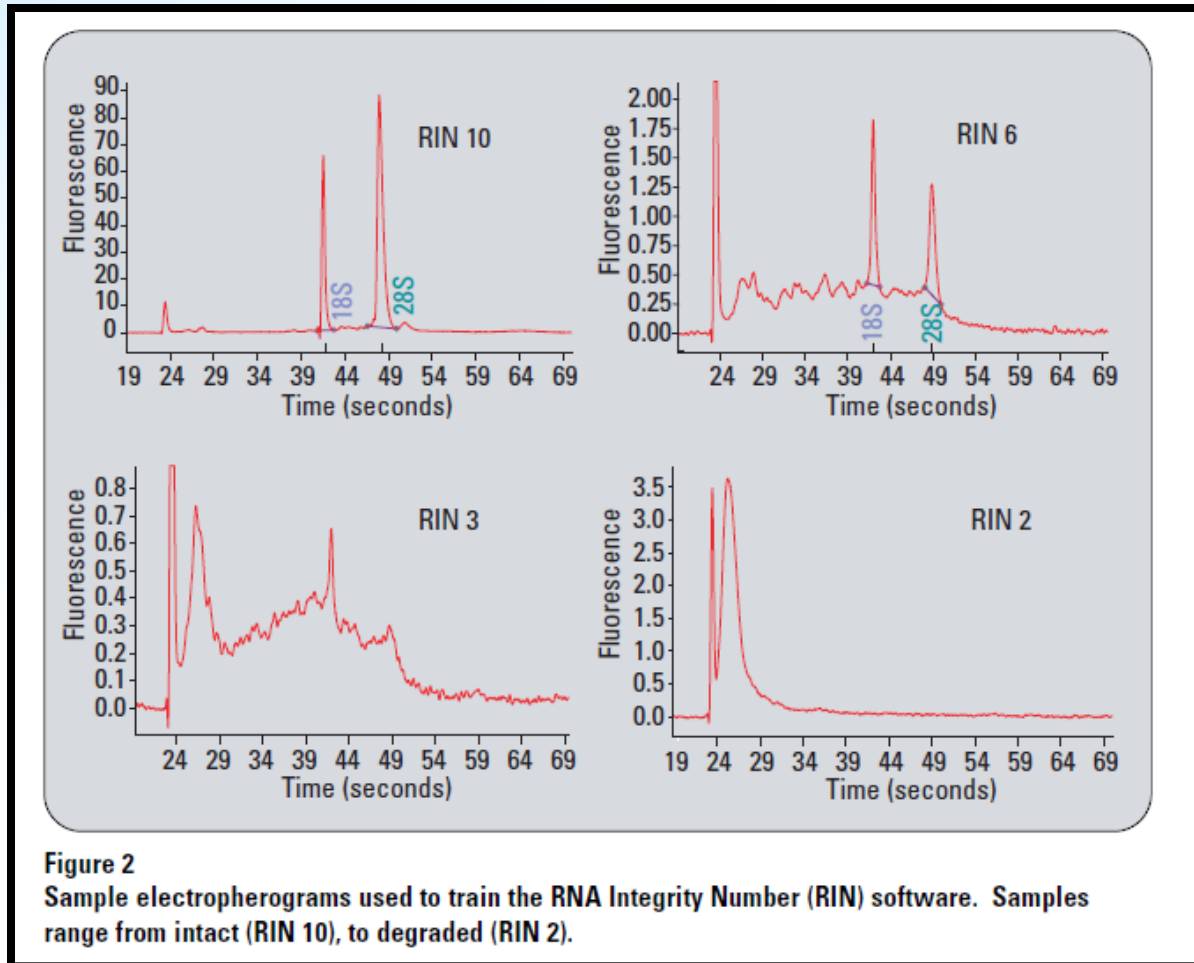
Templát - Izolace RNA



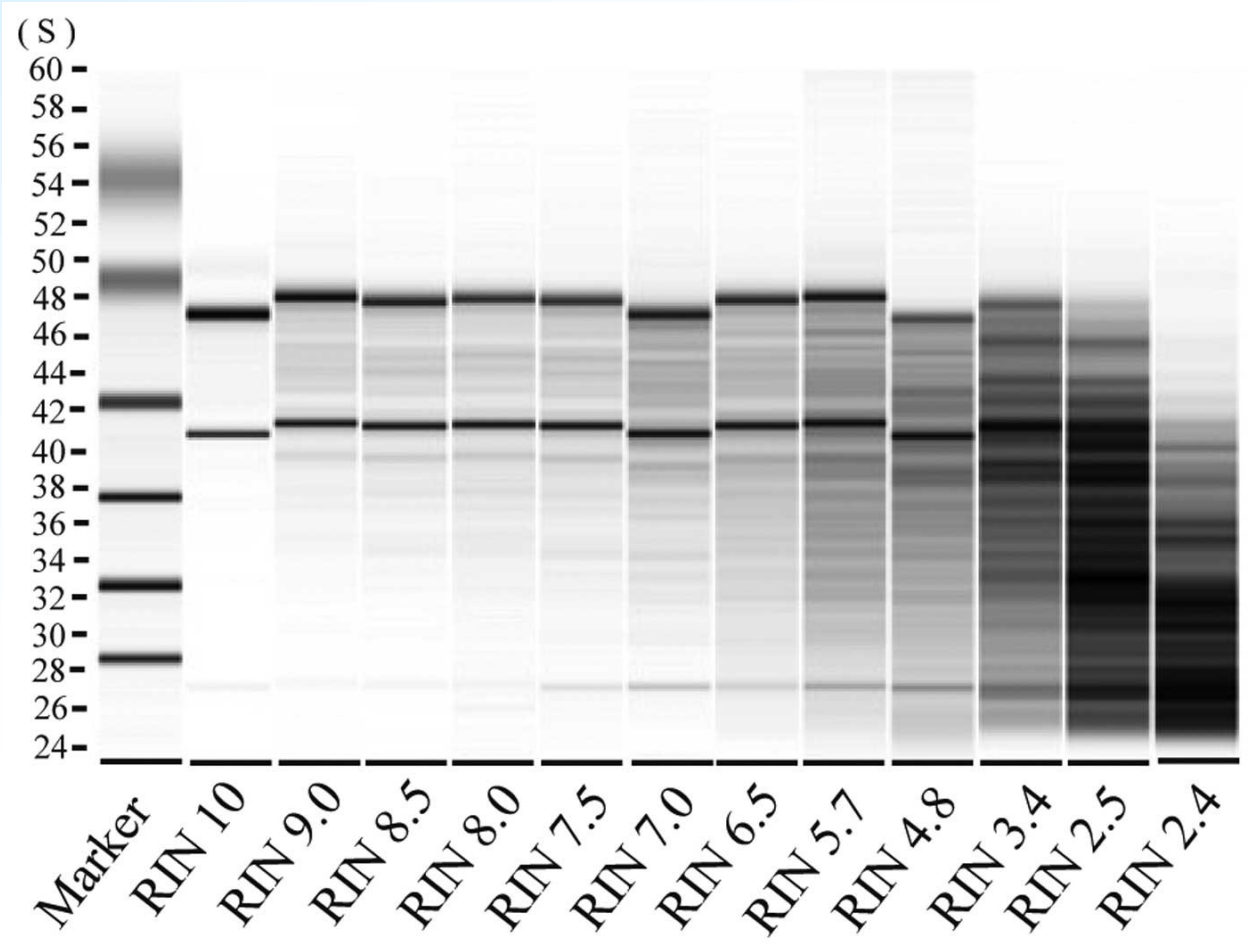
- Integrita (RNA Integrity Number - RIN) výpočet na základě 28S a 18S rRNA
- Čistota (A260/280; A260/230), přítomnost PCR inhibitorů
- Přesné určení koncentrace RNA
- Celková RNA nebo mRNA?
- Vhodnost metody, automatizace, výtěžek...



RIN



RIN



Manipulace

- RNA velice nestabilní, pracovat na ledu, okamžitě zamrazit
- Stabilita v -80C cca 1 rok – lepší skladovat cDNA
- DNA poměrně stabilní
- Co udělá UV s NK?

Reverzní transkripce (RT)

- Proces přepisu RNA do cDNA (komplementární DNA)
- Primery, reverzní transkriptáza, dNTP, pufr (Mg^{2+})
- Primery: oligo dT, random hexamers, gene specific
- Reverzní transkriptázy: HIV, AMV, MMLV

RT

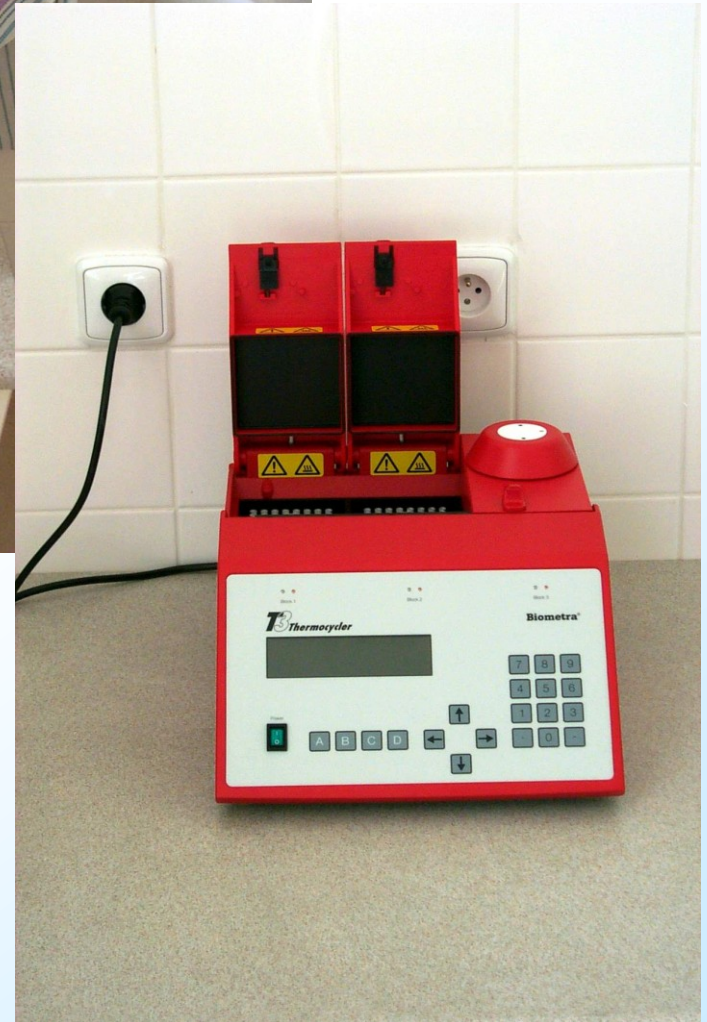
- Hned po izolaci
- Vždy stejné množství RNA do reakce a stejně přepsat
- Kontroly:
 - no RT (kontrola kontaminace genomickou DNA)
 - no template control (kontaminace)

Základní vybavení





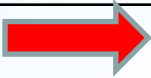
transluminátor
cyclor





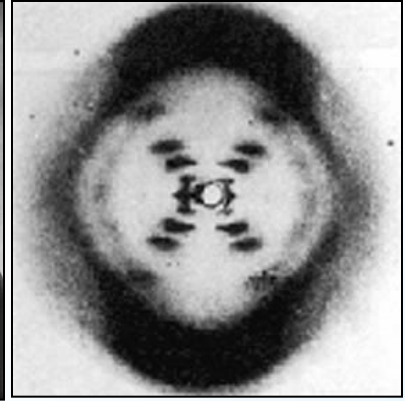
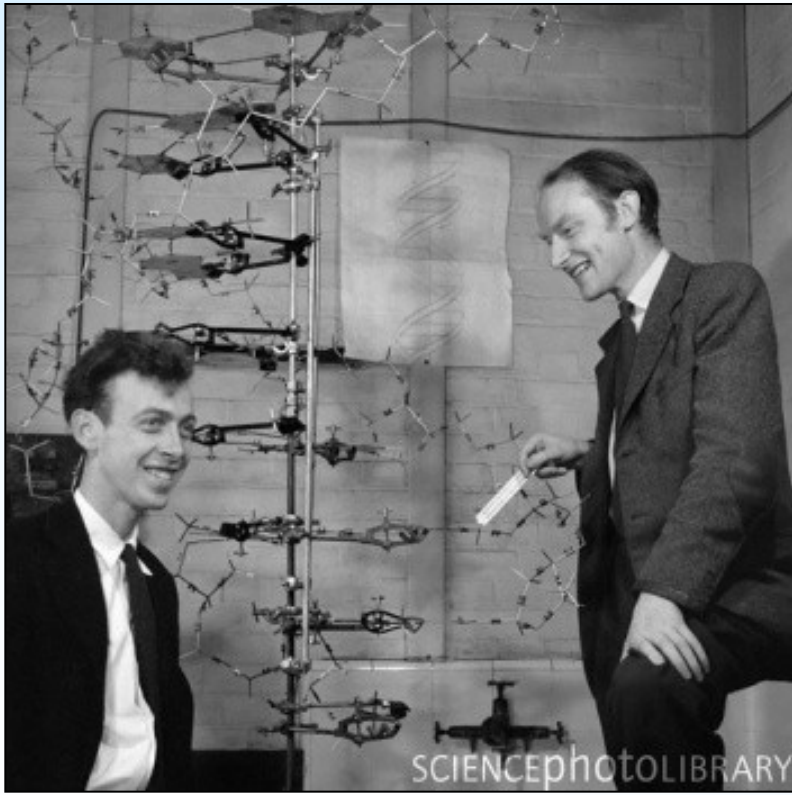
Molekulární technologie

1952	Elektroforéza
1967	<ul style="list-style-type: none">• Rekombinantní DNA• Objev DNA ligázy
1969	FISH
1970	<ul style="list-style-type: none">• Restrikční endonukleázy• Reverzní transkriptáza
1972	Klonování
1973	In vitro konstrukce bakteriálního plazmidu
1975	Southern blot
1977	Sekvenování DNA
1980	Koncept RFLP
1981	Western blotting
1982	<ul style="list-style-type: none">• Manipulace s genomem Drosophily – P elementy• Whole genome shotgun

1984	Pulzní gelová elektroforéza
1985	 <ul style="list-style-type: none">• PCR• DNA fingertying
1987	<ul style="list-style-type: none">• YACs• Místně cílená mutagenese
1988	Taq Polymeráza ChIP
1990	BLAST
1992	BACs
1995	Microarrays
1998	RNAi
2002	UCSC Genome Browser
2003	DNA assembly programs
2004	Anotace genů – ENSEMBL
2005	<ul style="list-style-type: none">• Projekt HapMap• Ligační sekvenování
2006	Celogenomové metylační mapy
2007	miRNA
2009	Next Generation Sequencing

What about DNA?

- Maurice Wilkins-James Watson-Francis Crick- **Rosalind Franklin**, 1953
- Dr. Franklin died in 1958
- Nobelova cena Wilkins-Watson-Crick, 1962
- model dsDNA



King's College London



Jakým způsobem zjistíte:

1. zda pacient nese nějakou klinicky významnou bodovou mutaci, která určuje jeho další léčbu?
2. který ze dvou genů je v nějaké tkáni exprimován více než druhý ?
3. druh patogenní bakterie u nemocného?
4. zastoupení leukemických buněk v krvi pacienta před a po léčbě?

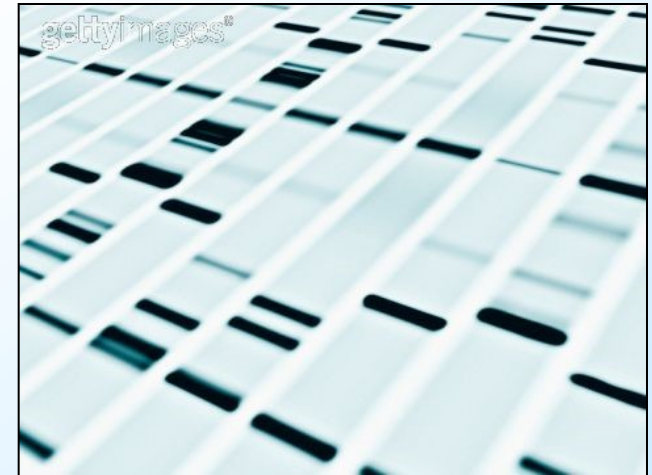


Southern

**Northern
Flowcyt**

**Kultivace, biochemické analýzy
PCR**

Cytogenetické vyšetření



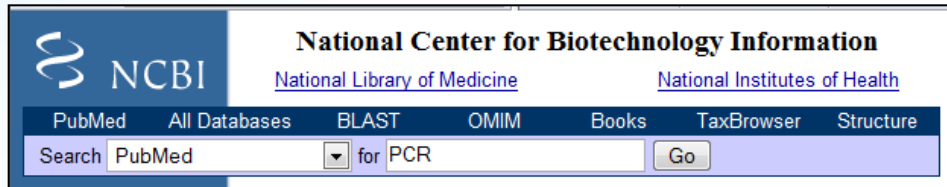
Kary B. Mullis



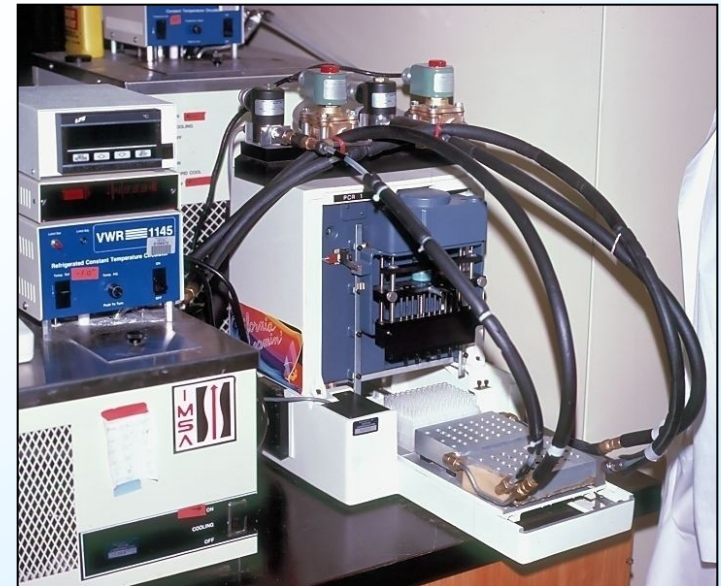
Nobelova cena za chemii
1993



- Použití termostabilní DNA polymerázy
- Rozvedení konceptu navrženého K. Kleppem
- Obrovský boom PCR díky technologickému pokroku



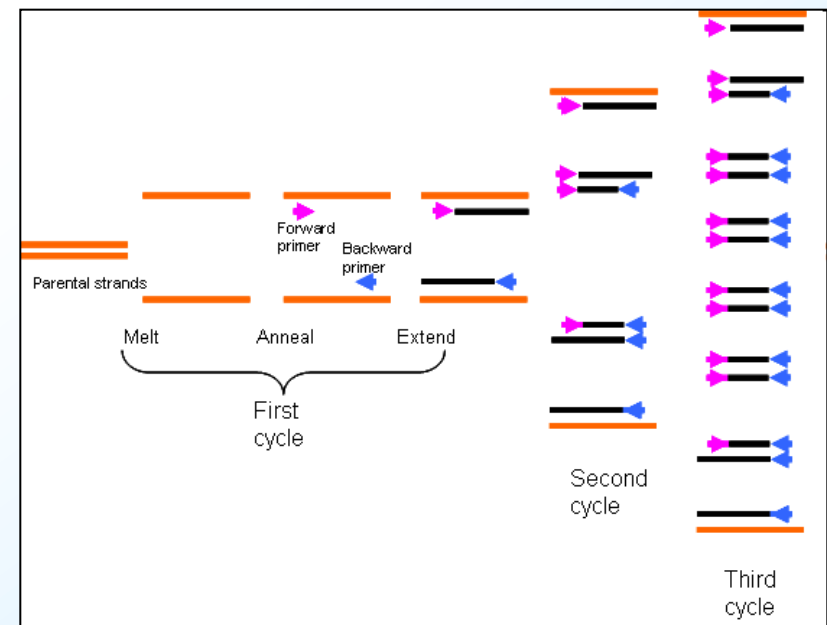
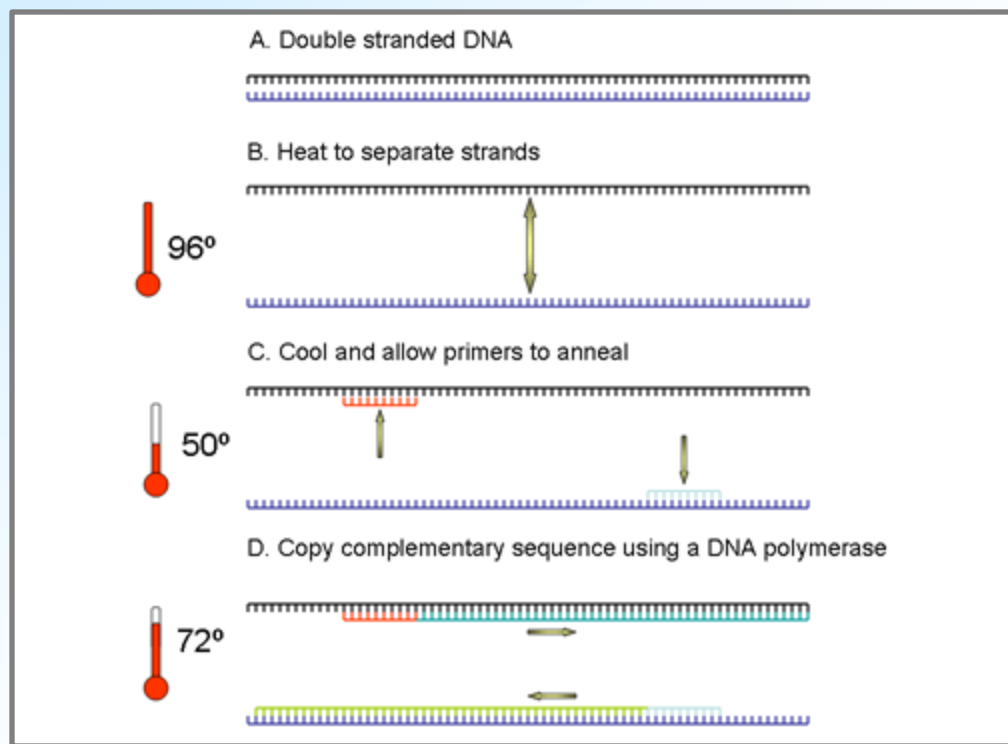
- 363 629 článků (27.11.2008)
- 399 022 (1.12.2009)
- 428 622 (15.12.2011)



PCR

Cyklické střídání fází denaturace, annealingu a extenze jednoduchou změnou teploty reakční směsi

Polymeráza využívá syntetické primery ohraničující amplifikovaný úsek DNA



Amplifikace DNA



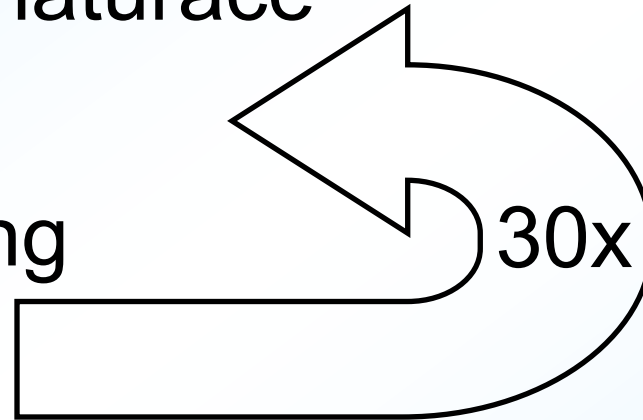
Základní komponenty reakce

- voda
- pufr
- dNTP (dATP+dTTP+dCTP+dGTP)
- $MgCl_2$
- Taq polymeráza

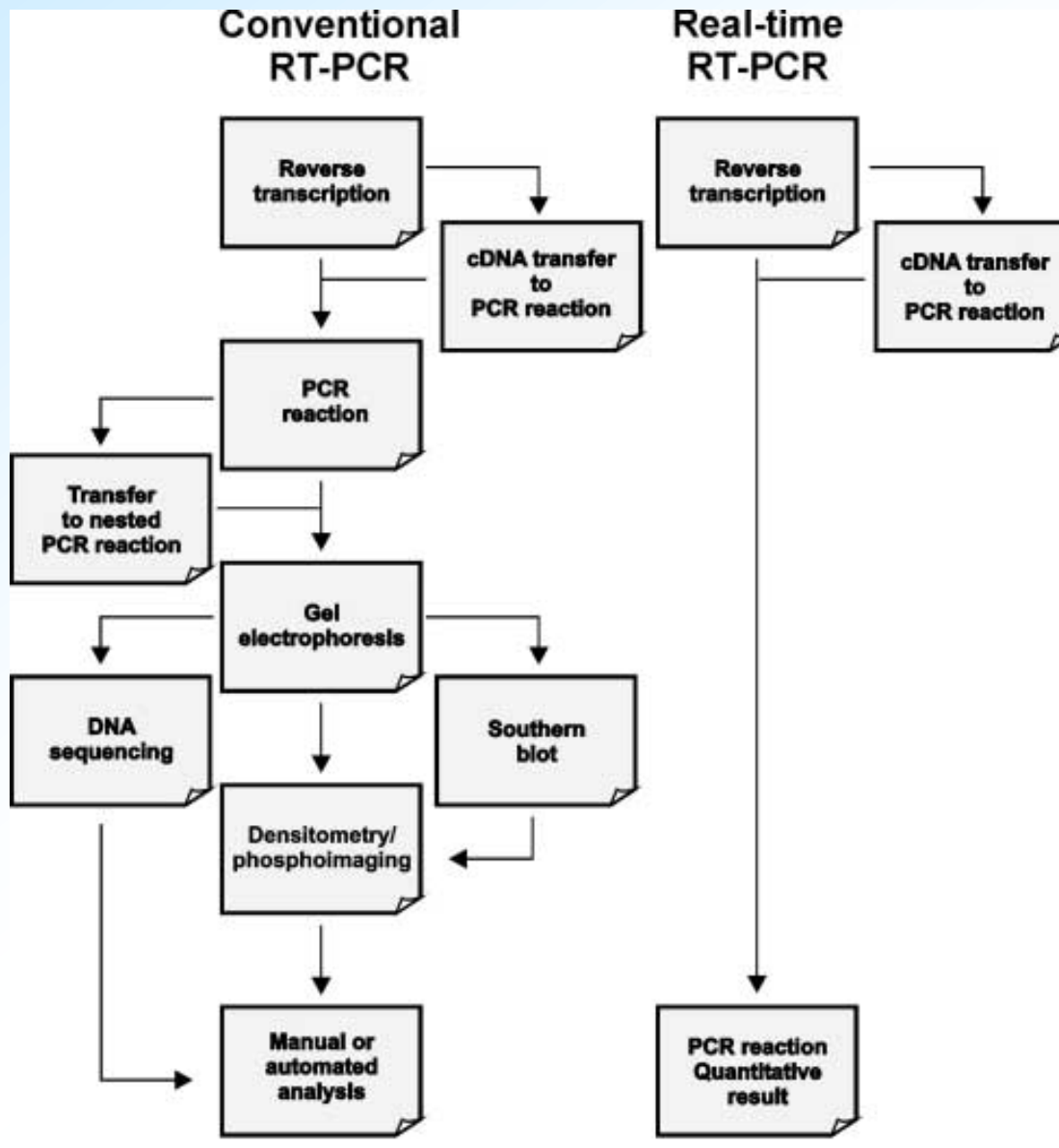
- primers
- templát

Teplotní režim

- 96°C Iniciální denaturace
- 96°C denaturace
- 40-72°C annealing
- 72°C elongace
- 72°C závěrečná elongace
- 4°C zchlazení



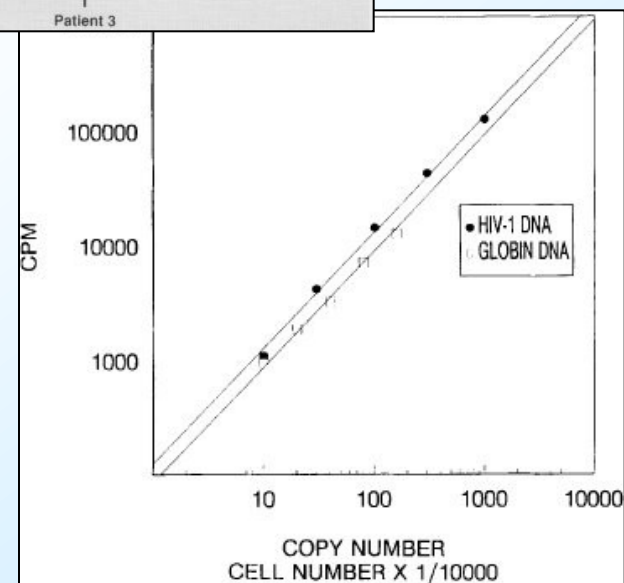
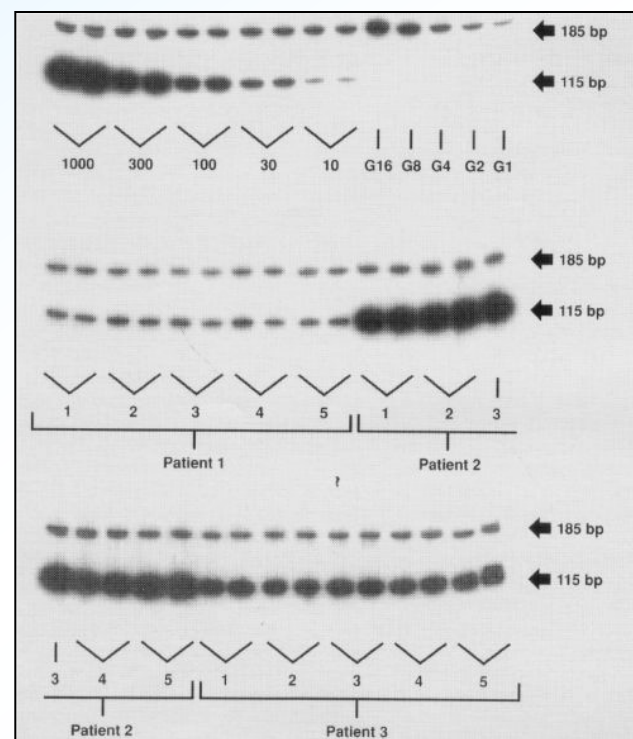
Kvantifikace pomocí PCR



Konvenční kvantitativní PCR

- „End point“ stanovení

- Kvalitativní odpověď YES/NO
- Extenzivní validace, kontroly
- Denzitometrie
- Minimální rozptyl v parametrech reakce má obrovský vliv na množství amplikonu
- Interní heterologní kontrola (housekeeping gene)
- *Viral load* u HIV+ pacientů
- Výskyt minimální reziduální choroby u onkologických pacientů



Zásadní omezení – gelová elektroforéza

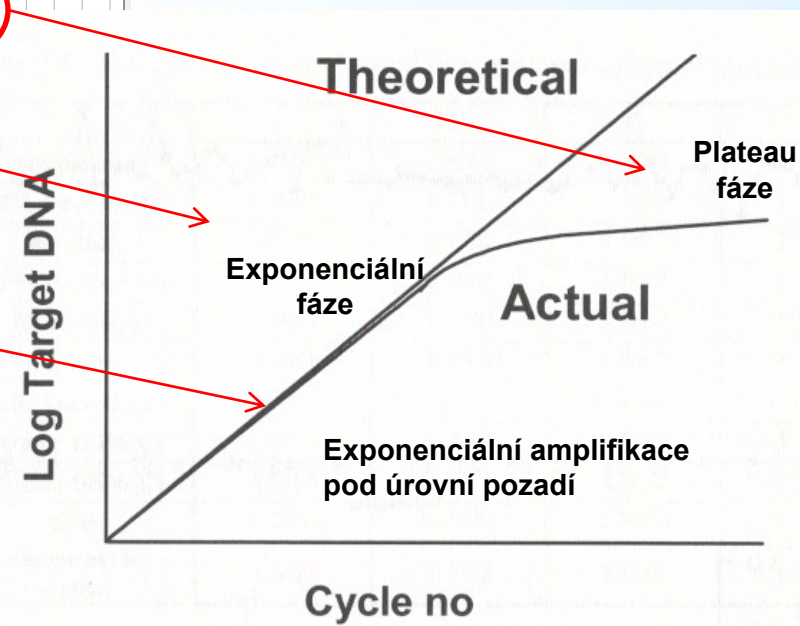


- Nízká přesnost
- Nízká citlivost
- Malý dynamický rozsah – pouze 2log.
- Nízké rozlišení, pouze na délce amplikonu
- Není automatizovaná
- Výstup není numerický – subjektivní hodnocení
- EtBr – neváže se na DNA pravidelně
- Post PCR zpracování - kontaminace

Kvantitativní vztah mezi

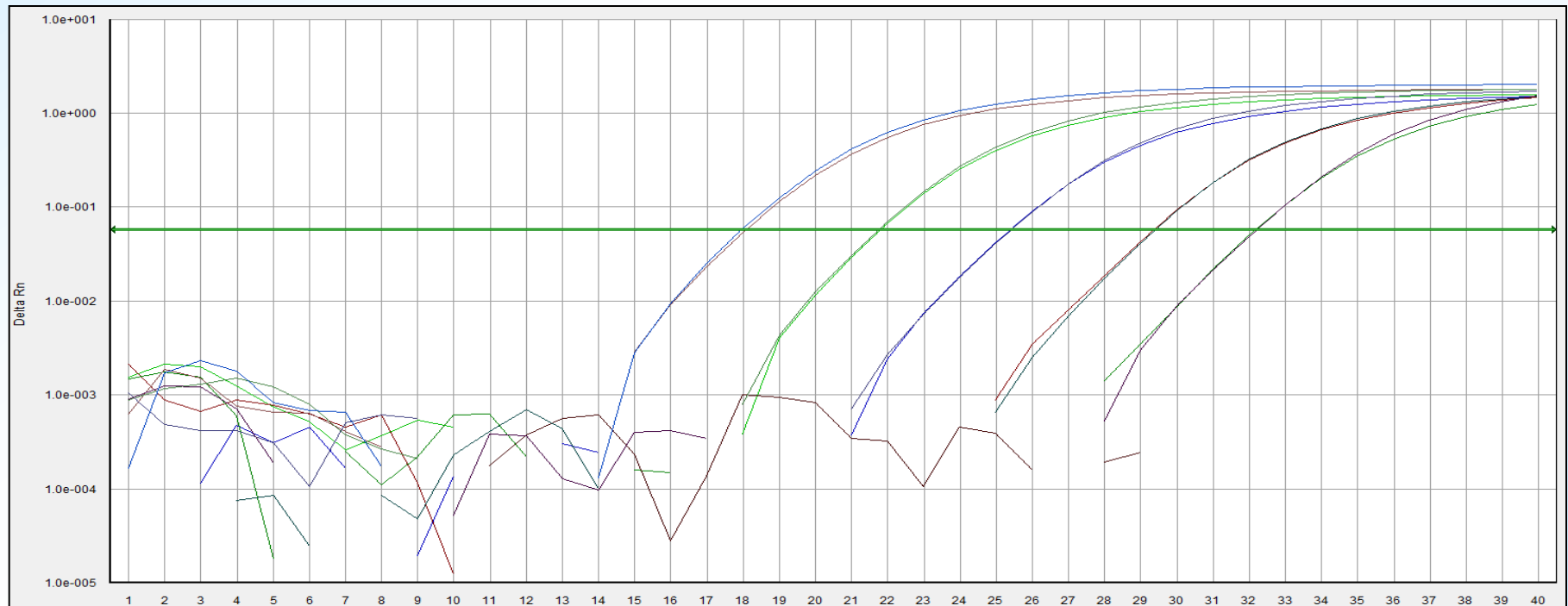
množstvím PCR produktu (amplikonu) a intenzitou fluorescence

- Amplifikační práh detekce (Ct)



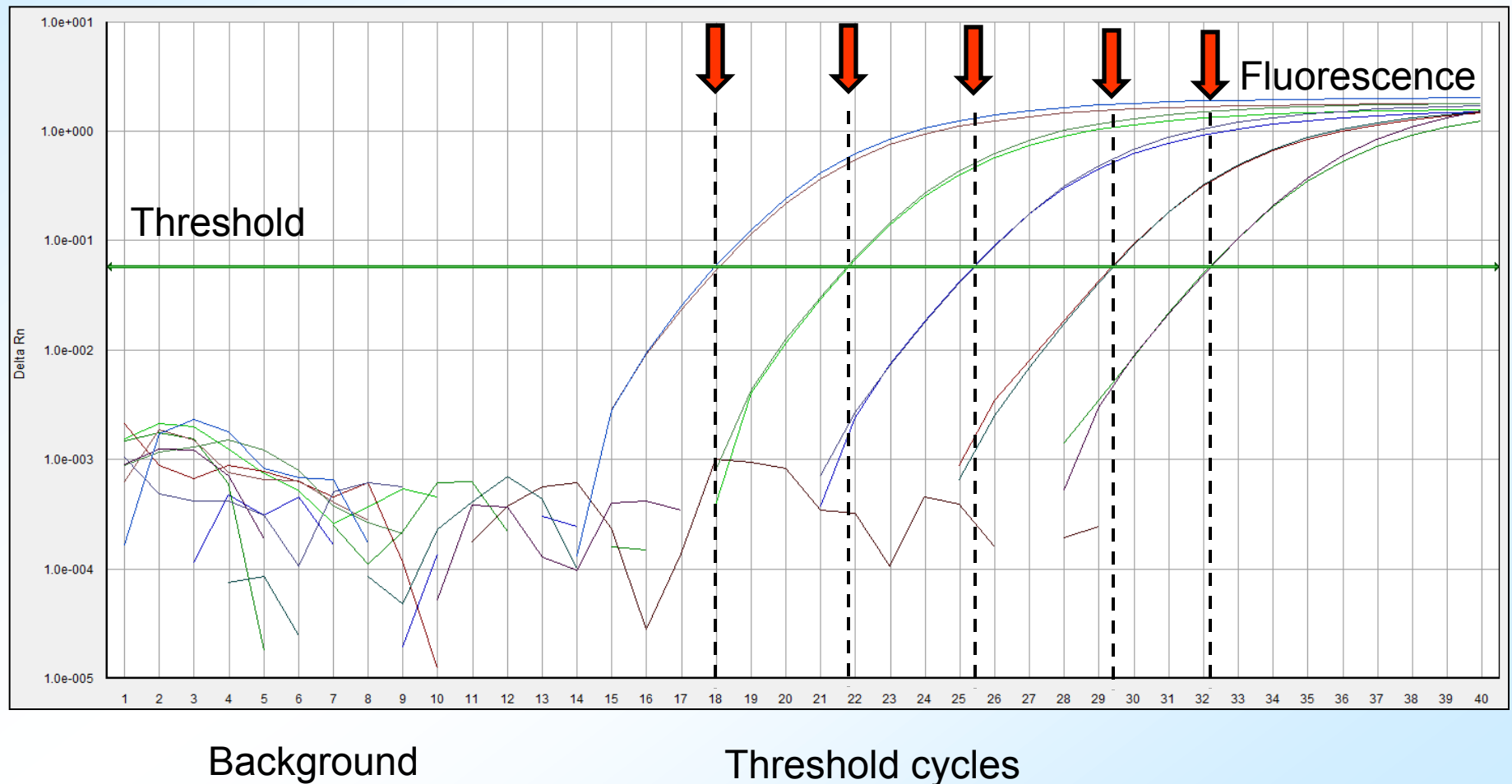
Real-time Fluorescence Based PCR

Fluorescence **R** je zajištěna např. vazbou fluorescenčního interkalačního barviva na DNA, použitím hydrolyzační sondy atd. Fluorescence reportérového fluoroforu je normalizována vůči pasivnímu fluoroforu (Rox) - **Rn**. Změnu fluorescence v čase vůči pozadí udává ΔRn . ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$).



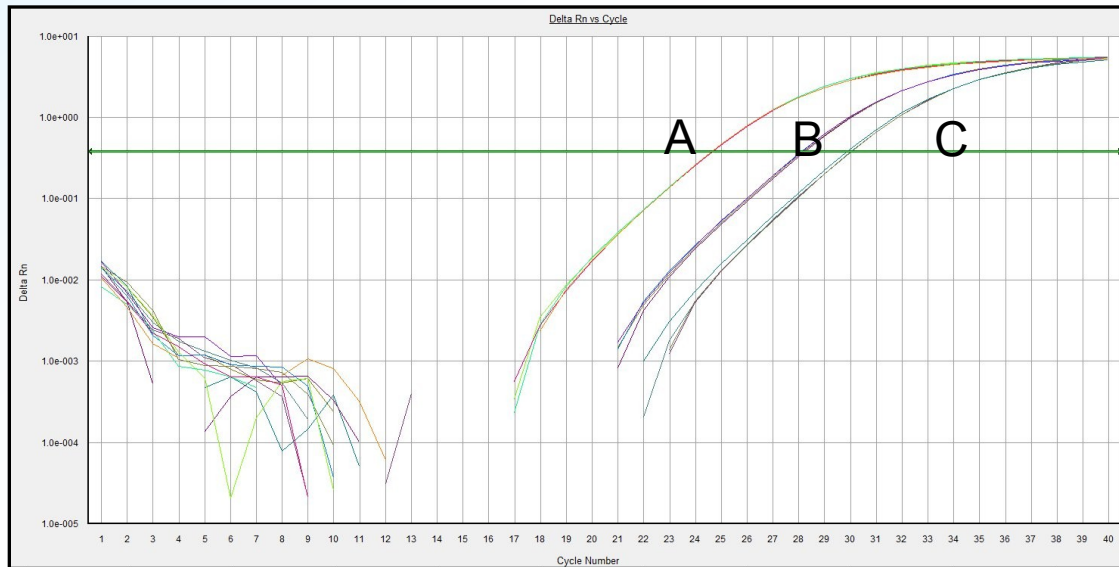
Threshold cycle „Ct“

- určený na základě hodnoty fluorescence pozadí (background) a aktuální fluorescence vzorku
- kvantitativní výstup pro každý vzorek



Threshold cycle „Ct“

- počáteční množství kopií templátu
- definovaný v exponenciální fázi PCR
- stejná účinnost PCR ve všech reakcích
- účinnost štěpení fluorogenní sondy nebo vazby fluoroforu na DNA
- citlivost detekce
- čím menší Ct - tím větší počet kopií templátu na začátku reakce



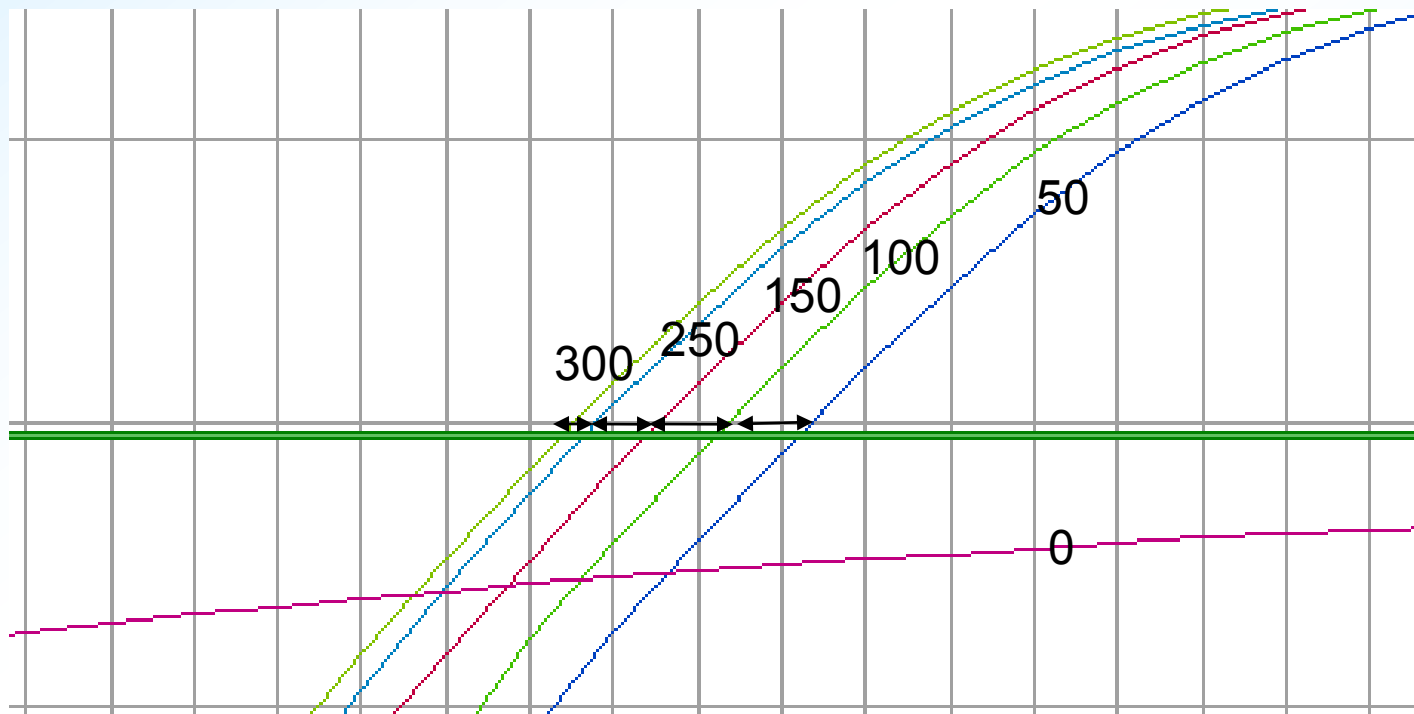
$A > B > C$

Threshold cycle „Ct“

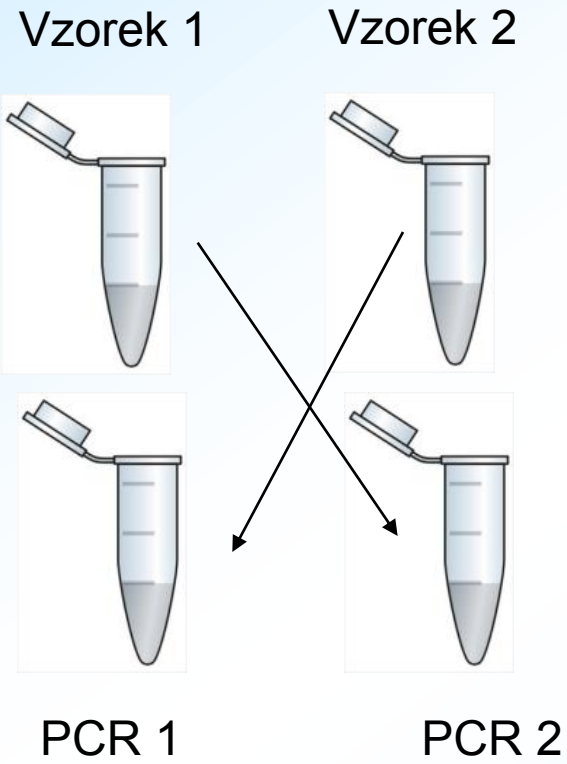
- rozdíl 1 Ct – dvojnásobné množství templátu $2^1 = 2$
- kolika cyklům odpovídá odpovídá 10ti násobný rozdíl v množství templátu?

(předpokládáme 100% účinnost PCR) $2^n = 10$

n=3,32



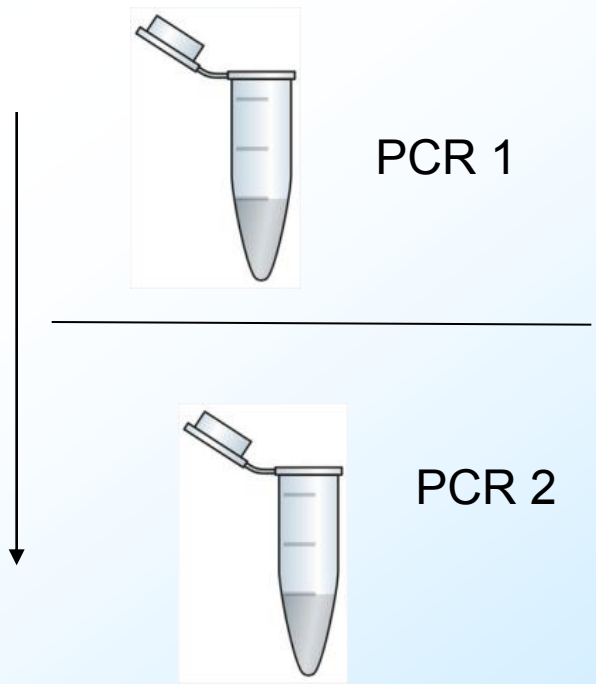
Cross contamination



Vzájemná
kontaminace
vzorků

Přenos amplikonu
do dalších PCR

Carry-over contamination

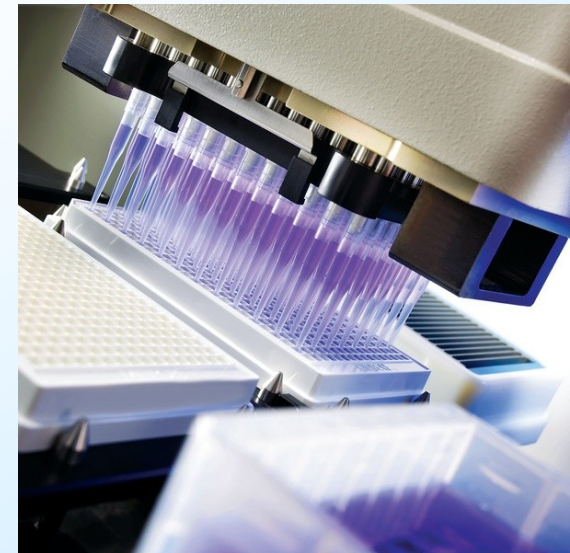
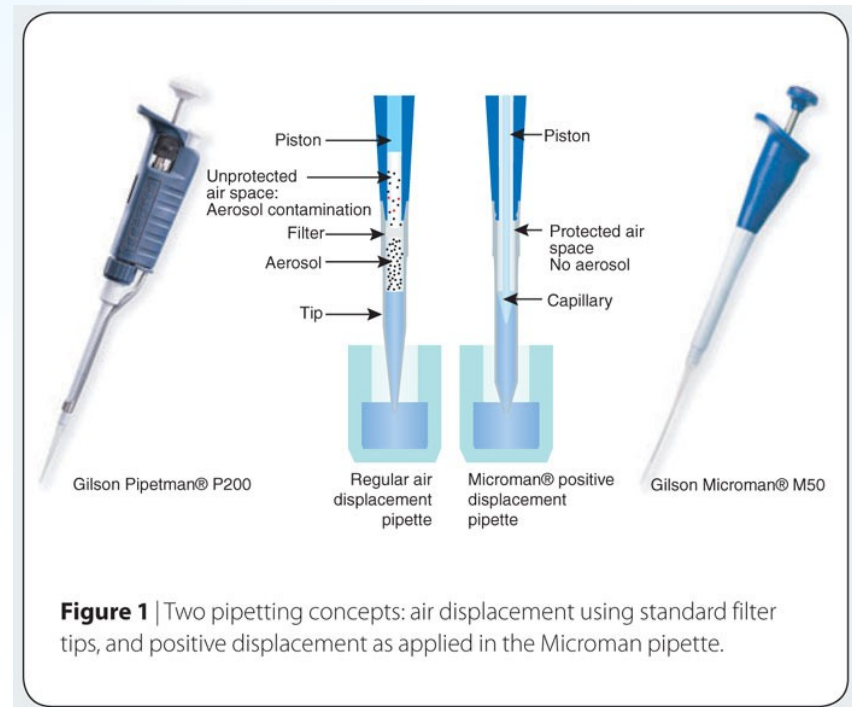
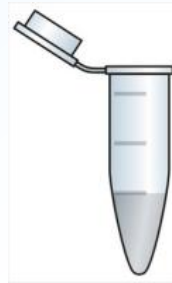


Jak předejít kontaminaci

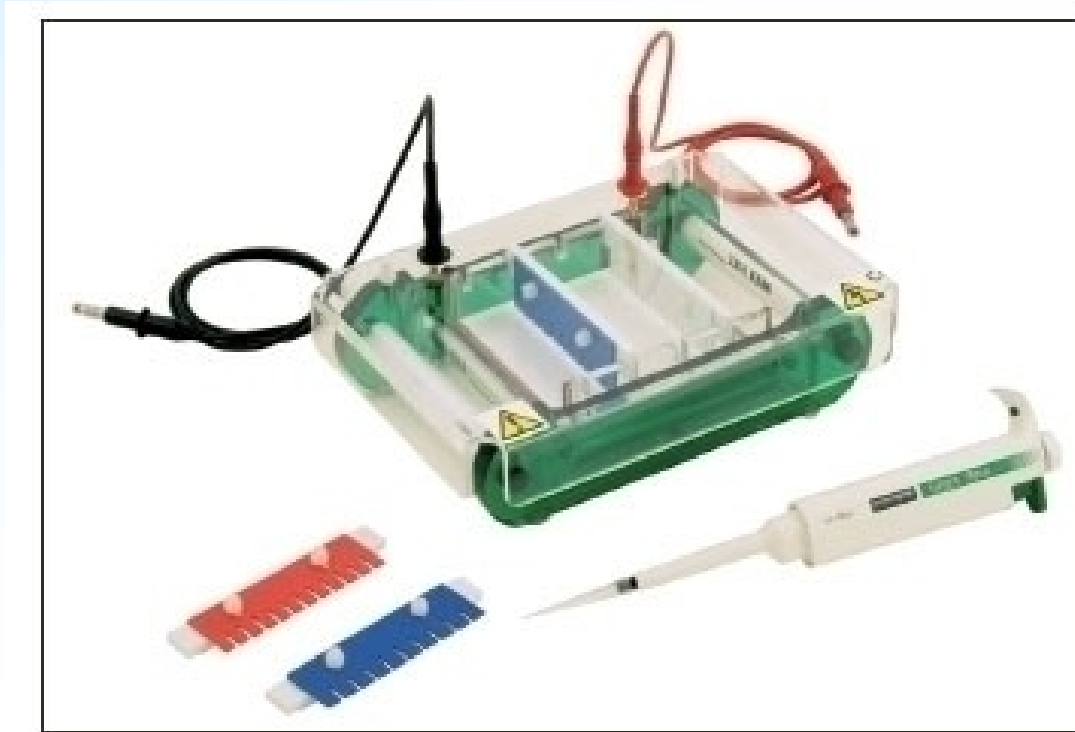
- Správná laboratorní praxe
- Plastik v RNA kvalitě
- Automatizace



×



Gelová elektroforéza

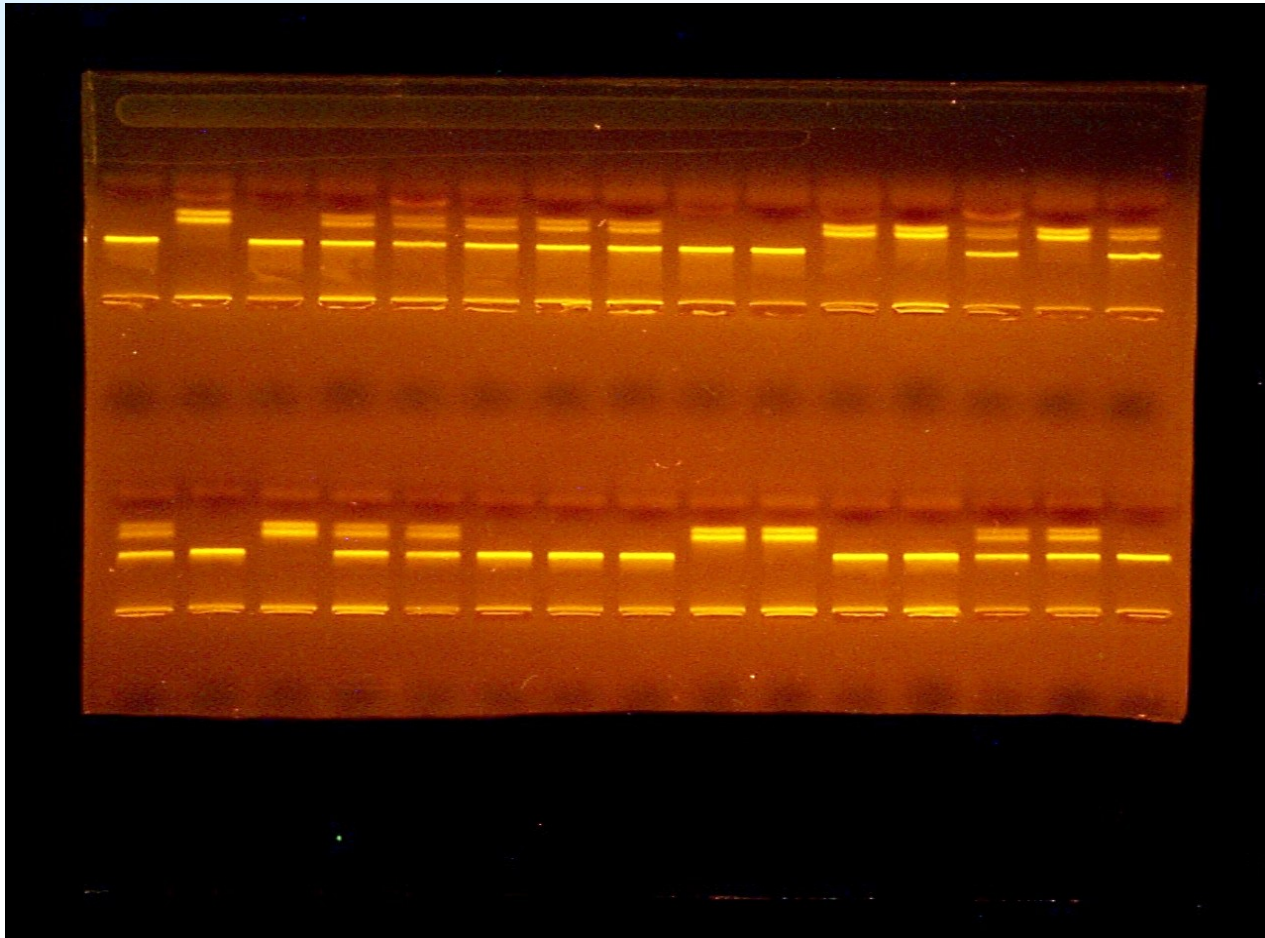


Mini plus

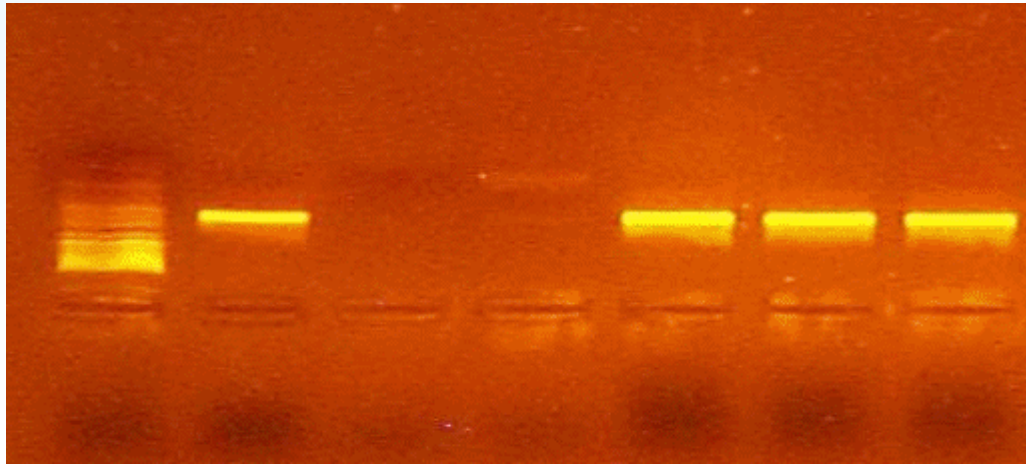
Gelová elektroforéza

- Metoda pro separaci a analýzu molekul DNA, RNA, proteinů
- Závislost na velikosti, uspořádání a náboje
- DNA putuje od záporného ke kladnému pólu
- Agaróza
- Etidium bromid
- Sybr green

Elektroforéza v agarovém gelu



+



-

Příště

- Izolace RNA pomocí Qiagen kolonek



Postup

